

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA**

Leandro Martins Lima

**Avaliação de atividade moluscicida de extratos de *Aristolochia cymbifera*
e *Pothomorphe umbellata* em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro
intermediário de *Schistosoma mansoni***

**Juiz de Fora
2016**

LEANDRO MARTINS LIMA

**Avaliação de atividade moluscicida de extratos de *Aristolochia cymbifera*
e *Pothomorphe umbellata* em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro
intermediário de *Schistosoma mansoni***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao corpo docente da
Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de
Fora, como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

**Juiz de Fora
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Leandro Martins.

Avaliação de atividade moluscicida de extratos de *Aristolochia cymbifera* e *Pothomorphe umbellata* em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* / Leandro Martins Lima. -- 2016.

47 f. : il.

Orientador: Olavo dos Santos Pereira Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2016.

1. Esquistossomose. 2. Moluscidas. 3. *Biomphalaria glabrata*. 4. *Aristolochia cymbifera*. 5. *Pothomorphe umbellata*. I. Pereira Júnior, Olavo dos Santos, orient. II. Título.

Leandro Martins Lima

**Avaliação de atividade moluscicida de extratos de *Aristolochia cymbifera*
e *Pothomorphe umbellata* em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro
intermediário de *Schistosoma mansoni***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao corpo docente da
Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de
Fora, como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico.

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Faculdade de Farmácia/UFJF

Prof^a. Dr^a. Florence Mara Rosa
Instituto de Ciências Biológicas/UFJF

Prof^a. Dr^a. Paula Rocha Chellini
Faculdade de Farmácia/UFJF

AGRADECIMENTOS

Que fique registrada a minha gratidão por todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na confecção deste trabalho. Ao meu orientador, prof. Olavo, pela ideia brilhante e confiança na minha capacidade de realizar o experimento. Ao prof. Ademar, à prof^a. Florence e aos alunos Matheus e Pollyana, do NIPPAN, por fornecerem parte do material utilizado e por apoiarem a realização deste trabalho. À prof^a. Paula Chellini por sua contribuição como banca avaliadora e por ajudar na parte estatística, “calcanhar de Aquiles” de muitos alunos, inclusive eu!

Aos meus pais, por se sacrificarem até o impossível para que eu e meus irmãos pudéssemos ter tudo o que fosse necessário para a realização de nossos sonhos e por finalmente entenderem que nem sempre as infinitas horas que passo por dia em frente ao computador significam lazer! Se não fosse por seus esforços, certamente eu não teria a oportunidade de pleitear o título de farmacêutico, que se aproxima cada vez mais.

À Isabela, peça fundamental para a realização deste trabalho. Sem suas atitudes motivadoras, certamente este trabalho não seria concluído a tempo. Dizem que por trás de um grande homem sempre há uma grande mulher. Se sou ou serei grande, não sei, mas tenho certeza de que sua grandeza e bondade ainda abrirá muitas portas para um futuro brilhante... comigo ao lado, assim espero! (rs rs)

Com amor,
Leandro Martins Lima

*“Saber não é o bastante, precisamos aplicar.
Querer não é o suficiente, precisamos fazer”*

Bruce Lee

RESUMO

Moluscos do gênero *Biomphalaria*, especificamente de três espécies, apresentam grande importância médica por serem hospedeiros intermediários do parasito *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose, doença de alto grau de morbidade e endêmica no Brasil. Dentre as medidas profiláticas adotadas pelo Ministério da Saúde, encontra-se o combate aos moluscos vetores através da aplicação de drogas moluscidas. Devido aos problemas relacionados ao uso em larga escala de niclosamida, a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas moluscidas de origem vegetal tem sido um atrativo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial moluscida de extratos de duas plantas diferentes em *Biomphalaria glabrata*. Foram testados extratos hidroalcoólico de raízes dos vegetais *Aristolochia cymbifera* Mart. e Zucc. (cipó mil-homens) e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (capeba). Após ensaios preliminares de exposição dos moluscos aos extratos vegetais por 24 horas, os extratos de *A. cymbifera* e *P. umbellata* apresentaram atividade moluscida, porém essa atividade não é considerada ideal, de acordo com parâmetros estabelecidos pela OMS. Foi observada a redução da ovoposição no grupo de moluscos expostos a *A. cymbifera*, na concentração de 25 µg.mL⁻¹.

Palavras-chave: moluscidas, *Biomphalaria glabrata*, Esquistossomose, *Aristolochia cymbifera*, *Pothomorphe umbellata*.

ABSTRACT

The snails of *Biomphalaria* genus, specifically three species, have great medical importance for being intermediaries of the parasite *Schistosoma mansoni*, which causes schistosomiasis, a high degree of morbidity and endemic disease in Brazil. One of the preventive measures adopted by the Ministry of Health is fighting the vector snails by application of molluscicides drugs. Due to problems related to large-scale use of Niclosamide, research and development of new molluscicides drugs of plant origin has been an attraction. In this work, we aimed to evaluate the molluscicidal potential of two different plants popularly used for other purposes on snails of the species *Biomphalaria glabrata*. Hydroalcoholic extracts of roots were tested: *Aristolochia cymbifera* Mart. and Zucc. (One-Thousand Men) and *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Capeba). After preliminary tests of exposure of snails to the plant extracts for 24 hours, extracts of *A. cymbifera* and *P. umbellata* showed molluscicidal activity, but this activity is not considered ideal, according to parameters established by World Health Organization (WHO). A reduction of oviposition in snails group exposed to *A. cymbifera* at a concentration of 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was observed.

Keywords: molluscicides, *Biomphalaria glabrata*, Schistosomiasis, *Aristolochia cymbifera*, *Pothomorphe umbellata*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico da espécie <i>Schistosoma mansoni</i>	17
Figura 2	Distribuição de moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> pelo Brasil, 2004.....	20
Figura 3	Gráfico de frequência absoluta de postura de massa de ovos por moluscos da espécie <i>B. glabrata</i> , após exposição aos extratos de <i>A. cymbifera</i> e <i>P. umbellata</i> , por dia de observação	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade moluscicida de extrato hidroalcoólico de raízes de <i>A. cymbifera</i> sobre <i>B. glabrata</i> , por um período de 24 horas...	32
Tabela 2	Atividade moluscicida de extrato hidroalcoólico de raízes de <i>P. umbellata</i> sobre <i>B. glabrata</i> , por um período de 24 horas...	34
Tabela 3	Atividade dos extratos de <i>A. cymbifera</i> (Ac25) e <i>P. umbellata</i> (Pu50) sobre a ovoposição de moluscos da espécie <i>B. glabrata</i> durante o período observado de 14 dias.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
DL ₅₀	Dose letal mediana
DL ₉₀	Dose letal de 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPF	Exame Parasitológico de Fezes
HPJ	Método de Sedimentação Espontânea de Hoffmann, Pons, Janer
MS	Ministério da Saúde
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
SISPCE	Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Esquistossomose mansônica	15
2.1.1	CICLO BIOLÓGICO DE <i>Schistosoma mansoni</i>	17
2.2	Hospedeiros intermediários	18
2.2.1	<i>Biomphalaria glabrata</i>	19
2.3	Moluscidas sintéticos	21
2.4	Moluscidas de origem vegetal	22
2.4.1	<i>Aristolochia cymbifera</i> (CIPÓ MIL-HOMENS).....	23
2.4.2	<i>Pothomorphe umbellata</i> (CAPEBA).....	24
2.5	Ensaio de toxicidade aguda: dose letal mediana	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivos gerais	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Material vegetal e preparo das soluções matrizes	27
4.2	Obtenção, características e manutenção dos moluscos	27
4.3	Ensaio de avaliação da atividade moluscicida dos extratos vegetais sobre <i>Biomphalaria glabrata</i>	28
4.4	Teste de avaliação de ovoposição dos moluscos	29
4.5	Análise estatística	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Avaliação da atividade moluscicida	31
5.1.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE <i>Aristolochia cymbifera</i>	31
5.1.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE <i>Pothomorphe umbellata</i>	33
5.2	Avaliação de ovoposição	36
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença endêmica típica de países da América, África e Ásia, geralmente vinculada a condições socioambientais e sanitárias precárias, sendo a espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, a que possui maior interesse para a saúde pública brasileira (KATZ & ALMEIDA, 2003; CATANHEDE *et al.*, 2010; BRASIL, 2014a).

No Brasil, moluscos de três espécies do gênero *Biomphalaria* apresentam grande importância epidemiológica como hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, por serem encontrados naturalmente infectados pelo parasito em seus habitats e por apresentarem ampla distribuição geográfica. Estas espécies são: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (D'orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1814) (MASSARA *et al.*, 2012; BRASIL, 2014b). A espécie *B. glabrata* foi notificada em 16 estados brasileiros e apresenta maior eficiência vetorial em relação às outras espécies, podendo atingir taxas de até 80% de espécimes infectados em seu habitat (BEZERRA, 2014; BRASIL, 2014b).

Um dos procedimentos para controle de esquistossomose, aprovado pela OMS, se dá pelo uso de moluscidas, aplicados em áreas onde existe grande risco de infecção pela doença (KING *et al.*, 2015). A niclosamida é o único moluscida sintético recomendado pela OMS, apresentando grande efetividade em programas para controle de esquistossomose, reduzindo a população de moluscos hospedeiros intermediários. Porém, devido à baixa seletividade, possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos moluscos e alto custo, apresentados pela niclosamida, a busca por moluscidas de origem vegetal tem aumentado (SILVA *et al.*, 2008; SILVA FILHO *et al.*, 2009; COELHO & CALDEIRA, 2016).

A *Pothomorphe umbellata* é uma planta arbustiva que apresenta atividades anti-inflamatória, antileishmania, tripanossomicida, antimalárica, antibacteriana, entre outras. Essa planta, também conhecida como capeba, pariparoba ou malvarisco, foi descrita em 11 estados brasileiros, sendo mais comum na Amazônia e na Mata Atlântica, (RUSCHEL, 2004; PERAZZO *et al.*, 2005; GILBERT & FAVORETO, 2010; MACHADO, 2014).

A *Aristolochia cymbifera* Mart. e Zucc. é comumente conhecida como cipó mil-homens, papo de peru, jarrinha e cassau e pertence ao gênero *Aristolochia*, composto por ervas, arbustos e cipós encontrados em regiões tropicais (WU *et al.*, 2004; SILVA JUNIOR *et al.*, 2013), sendo utilizada na medicina popular no tratamento de febre, diarreia, doenças de peles, apresentando atividade antiasmática, expectorante, entre outras (FRANCISCO *et al.*, 2008; SILVA JUNIOR *et al.*, 2013).

Os ensaios de toxicidade aguda são importantes e comumente utilizados para se avaliar a toxicidade apresentada por determinada substância química frente a um organismo-teste, num curto período de tempo de exposição. Consideram-se alguns critérios de avaliação como: mortalidade ou imobilidade dos organismos durante os experimentos realizados, sendo possível, portanto, calcular os valores de Dose Letal Mediana (DL₅₀) e de Dose Efetiva Mediana (DE₅₀) (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008; DAMATO & BARBIERI, 2011).

A escolha dos extratos hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* e *P. umbellata* para o trabalho é consequente de pesquisas, em andamento, do Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), de compostos isolados dessas plantas com atividade esquistossomicida, cujos resultados não foram divulgados até o momento. Considerando-se as pesquisas em andamento e a importância do combate ao vetor para a redução dos casos de esquistossomose, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o potencial moluscicida de extratos hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* e *P. umbellata* em *B. glabrata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica, conhecida também como barriga d'água, xistose ou doença do caramujo, é uma doença endêmica típica de países da América, África e Ásia, geralmente subdesenvolvidos, causada por parasitos da espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (classe Trematoda, família Schistosomatidae) (KATZ & ALMEIDA, 2003). Dentre as doenças tropicais que provocam morbidade, a esquistossomose está entre as mais graves, perdendo apenas para a malária (CATANHEDE *et al.*, 2010).

A doença foi registrada em 54 países. No Brasil, sua ocorrência está registrada em 19 estados, sendo que 99% dos casos acometem as regiões nordeste e sudeste, geralmente vinculada a condições socioambientais e sanitárias precárias (CATANHEDE *et al.*, 2010; BRASIL, 2014a). Dados do Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS – mostram que em 2011 foram notificados mais de 50 mil casos de esquistossomose em todo o Brasil e os óbitos causados pela doença notificados chegaram a 524 (BRASIL, 2014b). Dados do Ministério da Saúde (MS) apontam redução das ocorrências notificadas no decorrer dos anos, sendo registrados cerca de 33 mil casos em 2014, com 480 óbitos, e cerca de 20 mil casos em 2015, sem dados de óbitos (BRASIL, 2016).

Os sintomas da doença são febre, calafrio, fraqueza, anorexia, cefaleia, náusea, vômito, diarreia e hepatoesplenomegalia. A progressão da doença ocorre em três fases: dermatite cercariana, provocada pela penetração das cercárias na pele causando uma dermatite urticariforme eritematosa e fortemente pruriginosa. Essa etapa pode ser assintomática; esquistossomose aguda ou febre de Katayama, que se inicia em torno de 50 a 120 dias após a infecção, onde ocorre a manifestação dos sintomas descritos (ou pode ser assintomática) e ovoposição do parasito; e esquistossomose crônica, caracterizada por lesões fibromatosas esquistossomóticas, observadas a partir de seis meses de infecção, cujas manifestações clínicas dependem da localização do parasito e carga parasitária, podendo apresentar formas

intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica, neurológica (MELO & COELHO, 2005; PORDEUS *et al.*, 2008; SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015) e prostática (GOMES *et al.*, 2016).

O diagnóstico clínico da esquistossomose é feito a partir da anamnese minuciosa do paciente, avaliando-se a sintomatologia, considerando-se as possíveis fases da doença, e também dados epidemiológicos local, possibilidade de exposição à água contaminada e viagens a áreas endêmicas. A confirmação é feita laboratorialmente através de Exame Parasitológico de Fezes (EPF) pelo método de Kato-Katz, porém o Método de Sedimentação Espontânea de Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) é rotineiramente empregado, e métodos imunológicos (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA e imunofluorescência indireta, principalmente). O diagnóstico também pode ser feito por imagem através de ultrassonografia (MELO & COELHO, 2005; VITORINO *et al.*, 2012).

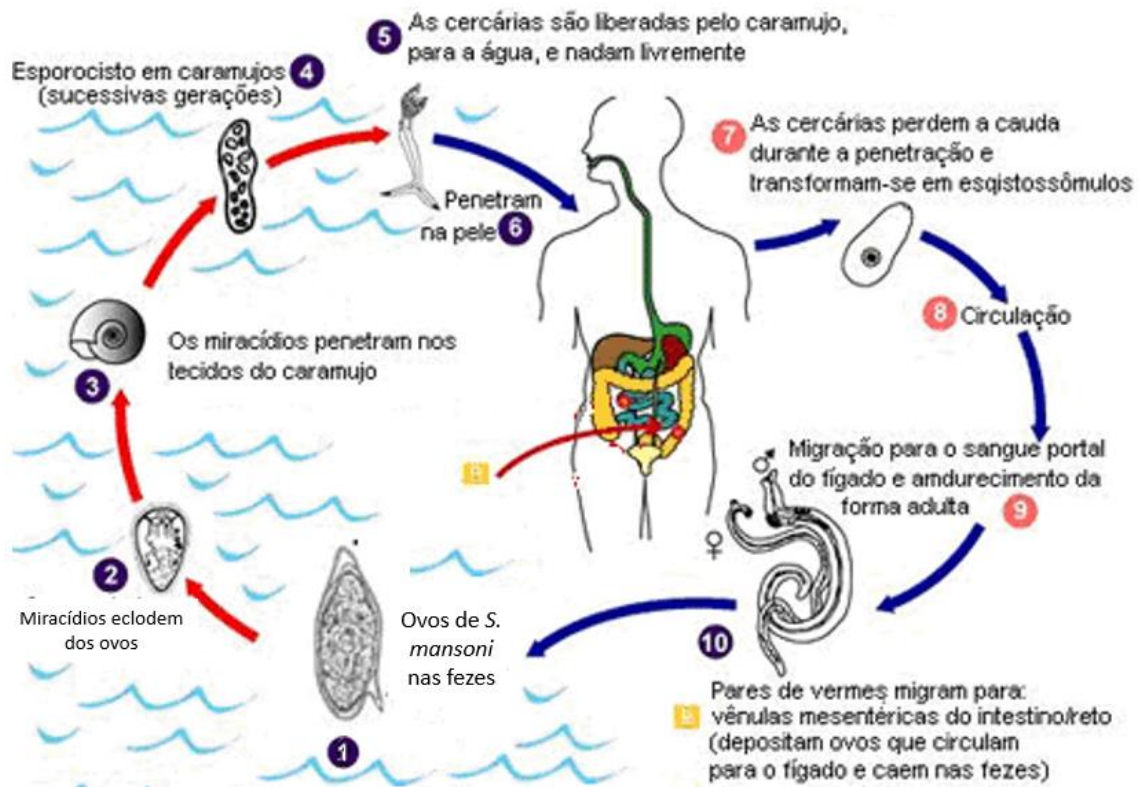
A Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um programa de medidas profiláticas que podem ser adotadas para o controle da esquistossomose, sendo: delimitação de áreas endêmicas e focais; saneamento básico e tratamento de águas; promoção da educação em saúde; modificação das condições de vida das populações expostas à doença; tratamento quimioterápico precoce da população doente; e combate aos moluscos hospedeiros intermediários (MELO E COELHO, 2005; CATANHEDE *et al.*, 2010; VITORINO *et al.*, 2012; BRASIL, 2014b).

O tratamento quimioterápico específico é feito com os fármacos praziquantel e oxaminiquine e objetiva evitar a propagação da doença e o desenvolvimento de formas graves. Estes fármacos apresentam índices de cura que variam de 60 a 95%. Em contrapartida apresentam muitos efeitos colaterais e poucas indústrias tem o interesse em desenvolver novos medicamentos para o tratamento devido ao baixo retorno financeiro. O tratamento cirúrgico também pode ser indicado em alguns casos (MELO E COELHO, 2005; CATANHEDE *et al.*, 2010; VITORINO *et al.*, 2012; BRASIL, 2014b).

2.1.1 CICLO BIOLÓGICO DE *Schistosoma mansoni*

Na **Figura 1** encontra-se um esquema do ciclo biológico do *S. mansoni*, explicado em seguida.

Figura 1. Ciclo biológico da espécie *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (adaptado pelo autor).

O parasito *Schistosoma mansoni* possui, em seu ciclo biológico, um hospedeiro intermediário (moluscos do gênero *Biomphalaria*, presentes em água doce) e um definitivo (homem ou alguns outros mamíferos) (NASCIMENTO, 2011; BRASIL, 2014b).

Indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni* eliminam ovos do parasito nas fezes, cuja eclosão acontece ao atingirem a água, sendo influenciada por luz intensa, oxigenação da água e temperaturas mais altas. Miracídeos eclodem dos ovos, que, ao se aproximarem de moluscos hospedeiros intermediários, têm sua atividade larvária intensificada, culminando com sua penetração em moluscos, podendo ocorrer em qualquer

parte exposta do molusco, porém preferencialmente na base das antenas e pé (MELO & COELHO, 2005; NASCIMENTO, 2011).

O miracídio passa, então, por duas fases de desenvolvimento: esporocisto primário e secundário, que contêm células germinativas. A formação de esporocisto secundário se dá em temperaturas entre 25 e 28 °C e esse processo pode ser significativamente retardado em temperaturas abaixo de 20 °C. A formação completa de cercárias, a partir de esporocistos, ocorre num período de tempo de 27 a 30 dias em temperaturas próximas de 28 °C (MELO & COELHO, 2005; NASCIMENTO, 2011).

As cercárias, influenciadas por condições ideais de temperatura e luz, deixam o hospedeiro intermediário, e, uma vez no ambiente aquático, nadam ativamente, sendo capazes de penetrar na pele e mucosas de seu hospedeiro definitivo. Em geral, a penetração ativa, que dura de 5 a 15 minutos, ocorre na região das pernas e pés do hospedeiro definitivo, já que essas partes do corpo são as que se encontram em contato com águas contaminadas. Após a penetração, as cercárias perdem sua cauda, se transformam em esquistossômulos, penetram em vasos sanguíneos ou linfáticos e alcançam o sistema porta-hepático. No sistema porta-hepático, os esquistossômulos se desenvolvem em machos e fêmeas, acasalam-se e migram para veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas realizam ovoposição. Os primeiros ovos são eliminados nas fezes aproximadamente 42 dias após a infecção do hospedeiro (MELO & COELHO, 2005; NASCIMENTO, 2011).

2.2 Hospedeiros intermediários

Naturalmente, os hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni* são moluscos da família Planorbidae, gastrópodes pulmonados e hermafroditas, tendo como habitat preferencial coleções de água doce parada, como lagos e lagoas, ou com pouca correnteza, como riachos e córregos (BRASIL, 2014b).

No Brasil são encontradas 11 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* (Planorbidae), mas apenas três tem importância epidemiológica por serem encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni*. São elas: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (D'orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1814) (BRASIL, 2014b). A presença de moluscos do

gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários naturalmente susceptíveis constitui condição necessária e indispensável para a manutenção e desenvolvimento do ciclo biológico do *S. mansoni* (MASSARA *et al.*, 2012).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* encontram-se amplamente distribuídos pelo território brasileiro, devido à fácil adaptabilidade ao ambiente. Estas espécies desenvolveram mecanismos de sobrevivência, que lhes permitem superar condições ambientais desfavoráveis, e apresentam mecanismo reprodutivo, autofecundação ou fecundação cruzada, altamente eficaz que promove um rápido repovoamento de criadouros, podendo um único molusco gerar cerca de 10 milhões de descendentes em três meses através da autofecundação. Apresentam longevidade de até dois anos, sendo encurtada quando infectados por miracídios, devido à espoliação parasitária e às lesões causadas nos tecidos pelo desenvolvimento das larvas (PARAENSE, 1955; BRASIL, 2014b).

2.2.1 *Biomphalaria glabrata*

Biomphalaria glabrata é a principal espécie hospedeira de *S. mansoni* no Brasil por apresentar alta susceptibilidade à infecção e se infectar por todas as linhagens geográficas do parasito. Os moluscos dessa espécie apresentam conchas com tamanhos que variam de 0,7 a 4 cm de diâmetro e podem atingir 1,1 cm de largura com seis a sete giros e paredes arredondadas, sendo o abrigo permanente de uma parte do corpo do molusco onde se encontram os órgãos envolvidos pelo manto (BEZERRA, 2005; BRASIL, 2008).

Para a identificação da espécie deve-se levar em consideração detalhes morfológicos da concha e de órgãos dos sistemas excretor e genital. Apesar de apresentar uma crista renal pigmentada sobre o tubo renal e um sistema reprodutor com bolsa vaginal bem definida como caracteres diagnósticos (CANTINHA, 2012), muitas vezes a identificação é dificultada pelo tamanho reduzido do molusco ou pelo processo de dessecação empregado, sendo recomendado o uso de técnicas moleculares para a diferenciação dos moluscos, nestes casos (BRASIL, 2008).

O amadurecimento sexual da espécie *B. glabrata* pode ser analisado pelas primeiras ovoposições, que se iniciam com 5 a 7 semanas de vida,

preferencialmente à noite, em forma de cápsulas ou massas de ovos contendo um número de ovos que variam de acordo com fatores ambientais, como temperatura, turbidez da água ou presença de substâncias tóxicas, ou presença de parasitismo no molusco (CANTINHA, 2012).

A distribuição da esquistossomose no Brasil geograficamente está quase sempre associada à distribuição de moluscos da espécie *B. glabrata*, notificados em 16 estados brasileiros e em 805 municípios, de acordo com a **Figura 2** (BRASIL, 2014b):

Figura 2. Distribuição de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* pelo Brasil, 2004.



Fonte: BRASIL, 2014b.

Os moluscos dessa espécie apresentam a maior eficiência vetorial da esquistossomose nas Américas, sendo relatadas taxas de até 80% de

espécimes infectados naturalmente em seus habitats, e podem eliminar até 18 mil cercárias por dia (BEZERRA, 2005).

2.3 Moluscidas sintéticos

O controle de esquistossomose pelo uso de moluscidas é um dos procedimentos aprovados pela OMS que impacta significativamente na redução da transmissão da doença quando aplicado regularmente em áreas de grande risco de infecção (KING *et al.*, 2015), porém sua eficácia pode ser afetada pelas condições físico-químicas do ambiente ou por características inerentes aos moluscos alvos, que favorecem sua sobrevivência (PILE *et al.*, 2002).

A niclosamida é um fármaco derivado da salicilamida com ação anti-helmíntica contra *Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Dipylidium caninum* e *Diphyllobothrium latum*, provavelmente devido à inibição da produção de adenosina trifosfato (ATP), necessário para o metabolismo em geral do parasito; com ação inibitória sobre a replicação de um coronavírus que provoca a síndrome respiratória aguda grave (COSTA, 2015); e apresenta potencial ação antitumoral, tendo como alvo as mitocôndrias de células cancerosas, o que provoca apoptose e inibição da expansão celular, entre outros mecanismos (JIN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014).

Além das aplicações citadas, a niclosamida é largamente utilizada para o tratamento de águas em programas de controle de esquistossomose, objetivando redução da população de moluscos hospedeiros intermediários (SILVA *et al.*, 2008), e é o único moluscida sintético recomendado pela OMS por ser altamente efetivo e menos prejudicial ao meio ambiente, em relação a outros moluscidas inorgânicos ou sintéticos (SILVA FILHO *et al.*, 2009). A droga provoca lesões focais na glândula digestiva, nos rins e nas gônadas, que se agravam relativamente com aumento da dose (PILE *et al.*, 2002).

Giovanelli e colaboradores (2002) comprovaram a rápida mortalidade dos moluscos diante da exposição à niclosamida, devido ao efeito de toxicidade aguda. Esse fato é desejável porque evita o comportamento evasivo do molusco ao entrar em contato com a droga. Além disso, no mesmo trabalho foi determinada a dose letal mediana (DL₅₀) e 90% (DL₉₀) para moluscos da

espécie *Biomphalaria glabrata* expostos a niclosamida, sendo $DL_{50} = 0,077 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $DL_{90} = 0,175 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Apesar da niclosamida apresentar baixa toxicidade em mamíferos (JIN *et al.*, 2010) e insignificante absorção no trato gastrintestinal (COSTA, 2015), esse fármaco apresenta baixa seletividade, que pode afetar o equilíbrio ecológico por atuar em outras espécies da fauna local; pode estimular o desenvolvimento de mecanismos de resistência dos moluscos à niclosamida; e o seu uso é limitado financeiramente em países em desenvolvimento devido ao alto custo de aplicação em áreas extensas. Dessa forma, é essencial a descoberta de novos moluscidas mais seletivos para espécies do gênero *Biomphalaria* e menos prejudiciais para o ecossistema aquático (SILVA *et al.*, 2008; SILVA FILHO *et al.*, 2009; COELHO & CALDEIRA, 2016).

2.4 Moluscidas de origem vegetal

Devido aos problemas citados com o uso de niclosamida, aumentou-se o interesse pelo desenvolvimento de moluscidas de origem vegetal nas últimas décadas. A obtenção desse tipo de produto visa baratear os custos de aplicação extensiva em coleções hídricas e apresentam vantagens por serem ecologicamente eficientes (SILVA FILHO *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos com moluscidas de origem vegetal datam a partir da década de 1930, chegando a um total de 1100 espécies vegetais estudadas no mundo para esta finalidade e aproximadamente 360 no Brasil, até 2008 (BRASIL, 2008). O Brasil é reconhecido por apresentar a maior diversidade genética de espécies vegetais do mundo e carece de estudos relativos às características de sua flora e estudos fitoquímicos detalhados, fatos estes estimulantes para a pesquisa e desenvolvimento de novos moluscidas vegetais (CATANHEDE *et al.*, 2010).

Os extratos vegetais podem ser classificados de acordo com a sua atividade moluscida como: inativos, quando provoca 0 a 30% de mortalidade; parcialmente ativos, quando provocam 40 a 60% de mortalidade; e ativos, quando a mortalidade é maior que 70%. Porém, atualmente considera-se que plantas moluscidas ativas são aquelas que provocam 90% de letalidade

(DL₉₀) em uma população de moluscos em concentrações de até 100 µg.mL⁻¹ para extrato vegetal bruto (CATANHEDE *et al.*, 2010).

2.4.1 *Aristolochia cymbifera* (CIPÓ MIL-HOMENS)

A família Aristolochiaceae é composta por 7 gêneros, sendo o gênero *Aristolochia* o de maior importância em relação ao uso medicinal, abrigando cerca de 400 espécies, entre ervas, arbustos e cipós, comumente encontrados em regiões tropicais, principalmente na Ásia, África e América do Sul (WU *et al.*, 2004). A espécie *Aristolochia cymbifera* Mart. e Zucc. é comumente conhecida como cipó mil-homens, papo de peru, jarrinha e cassau (SILVA JUNIOR *et al.*, 2013).

O cipó mil-homens tem sido empregado na medicina popular para o tratamento de febre, diarreia, doenças entéricas bacterianas e problemas estomacais, feridas e doenças de pele, nas formas de chás e infusões ou macerado de partes das plantas. Há relatos de emprego como antiasmáticos e expectorantes, antiofídicos, auxiliar em terapias de emagrecimento e também apresenta atividade abortiva ou que provoca menstruação (FRANCISCO *et al.*, 2008; SILVA JUNIOR *et al.*, 2013). Além dos usos citados, um medicamento fitoterápico composto com extrato de *A. cymbifera* e extratos de outros vegetais é comercializado para o uso no tratamento auxiliar da inapetência e debilidade física (RAUBER *et al.*, 2006).

Baseando-se em usos etnofarmacológicos, diversos estudos têm sido desenvolvidos buscando-se esclarecer os princípios ativos de *A. cymbifera*. Dentre esses estudos, Buckner e Navabi (2010) citaram a atividade tripanossomicida relacionada ao composto *dibenzylbutyrolactone lignan* isolado de extratos de folhas *A. cymbifera*, e Silva Junior e colaboradores (2013) destacaram o potencial antimicrobiano de compostos contidos em extratos de caules de *A. cymbifera*, associados à estreptomicina, com atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Shigella flexneri*.

2.4.2 *Pothomorphe umbellata* (CAPEBA)

A família Piperaceae é representada por 10 gêneros e cerca de 2000 espécies entre ervas, arbustos, pequenas árvores e cipós, ocorrendo em regiões tropicais, geralmente em locais sombreados (BARDELLI *et al.*, 2008). *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., com sinonímia de *Piper umbellatum* L., é uma planta arbustiva que atinge 1 a 3 metros de altura, de folhas largas (15 a 23 centímetros) e flores pequenas e discretas de cor creme esverdeada. Está distribuída geograficamente pela América Central e América do Sul. No Brasil, a planta foi descrita em 11 estados de todas as regiões, mas é mais comumente encontrada na Amazônia e na Mata Atlântica. Alguns dos nomes comuns são capeba, pariparoba e malvarisco (RUSCHEL, 2004; GILBERT & FAVORETO, 2010).

Na medicina popular, a capeba é comumente utilizada, interna ou externamente, como infusão de raízes ou macerado das folhas, caules e frutos, ou como xarope das folhas. Como xarope, a planta é indicada para tratamento complementar de tosse e bronquite. Como infusão, há relatos de uso para problemas hepáticos e da vesícula, má digestão, dores musculares e de cabeça, reumatismo, furúnculos e queimaduras leves, entre outras finalidades (GILBERT & FAVORETO, 2010).

Com base na medicina popular, vários trabalhos científicos foram elaborados a fim de comprovar as ações relatadas. Silva (2007) descreveu as atividades antioxidantes atribuídas aos extratos de *P. umbellata*, especificamente ao composto derivado sesquiterpênico 4-nerolidilcatecol, e estudou a capacidade fotoprotetora atribuída a este composto, importante para prevenção contra a fotocarcinogênese. Hernandez (2010) caracterizou pela primeira vez a ação antiulcerativa de extratos de raízes de capeba, atribuindo essa atividade aos compostos isolados caldensina, piperumbellactamas A e piperumbellactamas B. Outras atividades farmacológicas foram relatadas por diversos autores: anti-inflamatória (PERAZZO *et al.*, 2005), antifúngica (RODRIGUES *et al.*, 2012), antineoplásica (SACOMAN *et al.*, 2008), antileishmania, tripanossomicida, antimalárica, antibacteriana, antiofídica e antiaterogênica (MACHADO, 2014).

2.5 Ensaio de toxicidade aguda: dose letal mediana

Para se avaliar a toxicidade apresentada por uma substância química ou um efluente são comumente utilizados os testes de toxicidade, que são estimativas da concentração de uma substância biologicamente ativa, observando-se os efeitos em organismos utilizados nos testes. Esses ensaios se baseiam na exposição desses organismos a diferentes condições-teste, a fim de verificar seus possíveis efeitos letais e subletais. Os ensaios de toxicidade são divididos em testes de curta ou longa duração: ensaio agudo ou crônico, respectivamente (DAMATO & BARBIERI, 2011).

Os ensaios de toxicidade aguda têm como finalidade avaliar uma resposta rápida que os organismos apresentam quando expostos a determinada substância, num período de tempo entre 24 e 96 horas (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). Geralmente, os critérios considerados nesse tipo de teste são a medida da mortalidade ou imobilidade do organismo durante os experimentos. Portanto, os ensaios de toxicidade aguda são importantes para estimar a concentração em que a substância avaliada apresenta efeitos deletérios para os organismos testados (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008; DAMATO & BARBIERI, 2011).

A partir de testes de toxicidade aguda realizados, torna-se possível calcular a Dose Letal Mediana (DL_{50}) e a Dose Efetiva Mediana (DE_{50}). A DL_{50} consiste na concentração da substância que causa morte de 50% da população de organismos testados, durante determinado tempo de exposição dos mesmos à substância estudada, enquanto que a DE_{50} equivale à concentração da substância responsável por causar imobilidade de 50% da população de organismos-teste (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Além dessas medidas, é possível também proceder com a avaliação de condições fisiológicas e comportamentais dos organismos expostos à substância, como metabolismo, capacidade de natação ou adesão, produção de substâncias que indicam estresse, entre outros (DAMATO & BARBIERI, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar se extratos hidroalcoólico de raízes dos vegetais das espécies *Aristolochia cymbifera* e *Pothomorphe umbellata*, possuem atividades moluscicidas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial moluscicida de extrato hidroalcoólico de raízes de *Aristolochia cymbifera* e de extrato hidroalcoólico de raízes de *Pothomorphe umbellata*, em diferentes concentrações, em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*;
- determinar dose letal mediana (DL₅₀) e dose letal de 90% (DL₉₀) para os extratos que apresentarem atividade moluscicida;
- avaliar os efeitos dos extratos vegetais em relação as atividades gerais desses organismos (motilidade, retração, resposta a estímulo, excreção e alimentação);
- avaliar os efeitos dos extratos vegetais estudados sobre a taxa de ovoposição dos moluscos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e preparo das soluções matrizes

O material vegetal utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Professor Doutor Ademar Alves da Silva Filho, coordenador do Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foram disponibilizados 3 gramas de extrato hidroalcoólico de *Aristolochia cymbifera* (Cipó mil-homens) e 1,8 gramas de extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellata* (Capeba), ambos preparados a partir de raízes das respectivas plantas.

Após obtenção do material vegetal, foi feito o preparo de uma solução padrão contendo 30 mg.mL⁻¹ dos diferentes extratos testados, separadamente. Ambos os extratos apresentavam aspecto resinoso, portanto foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2 Obtenção, características e manutenção dos moluscos

Os moluscos foram cedidos gentilmente pela Professora Doutora Florence Mara Rosa do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, em um total de 50 espécimes.

Os moluscos utilizados nos experimentos foram da espécie *Biomphalaria glabrata*, adultos e com tamanho médio de 2 cm (variando de 1,6 a 2,5 cm). Esses moluscos foram transportados em recipientes adequados para o moluscário da Faculdade de Farmácia da UFJF e foram mantidos em repouso por 48 horas antes do início dos ensaios. Os moluscos inicialmente não utilizados nos ensaios foram mantidos em recipientes com água decolorada, renovada de 4 em 4 dias e alimentados com alface hidropônico fresco diariamente. Em cada recipiente havia também um substrato de isopor para que fosse estimulada a ovoposição. Esta placa foi trocada quando se acumulavam em torno de 8 massas de ovos, sendo transferida para um outro recipiente maior, com o intuito de se manter ativo um criadouro de caramujos

para futuros experimentos. Dados de temperatura não foram coletados. Os experimentos foram realizados em julho de 2016.

4.3 Ensaio de avaliação da atividade moluscicida dos extratos vegetais sobre *Biomphalaria glabrata*

A avaliação da atividade moluscicida dos extratos vegetais foi baseada em recomendações de Silva e colaboradores (2008), com algumas modificações, sendo este um ensaio de toxicidade aguda. Os moluscos foram divididos em grupos de acordo com as concentrações dos experimentos para cada extrato, com cinco moluscos por grupo. Para o ensaio com *Aristolochia cymbifera* foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e para o ensaio com *Pothomorphe umbellata*, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em cada grupo, cinco moluscos foram expostos aos extratos, individualmente, por 24 horas em recipientes-teste contendo um volume total de 10 mL de solução aquosa na concentração desejada.

Para o controle negativo, foram utilizados cinco moluscos mantido em solução aquosa de DMSO na proporção de 1,7% v/v. O procedimento de exposição dos moluscos ao DMSO foi o mesmo empregado aos moluscos expostos aos extratos. A concentração da solução aquosa de DMSO está relacionada com uma quantidade de DMSO maior que a presente em uma solução de extratos a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para que seja descartada a interferência do diluente nos ensaios.

Após o tempo de exposição aos extratos e ao DMSO, as atividades gerais (condições fisiológicas e comportamentais) dos moluscos foram avaliadas considerando-se os parâmetros de motilidade, retração, resposta a estímulo (tempo e velocidade de resposta ao contato de uma espátula com as partes moles do molusco: resposta rápida e vigorosa foi considerada normal) e presença/ausência de excretas. Durante o período de exposição de 24 horas, os moluscos não receberam alimento. Além disso, foi feita a contagem de moluscos que sobreviveram e que morreram, gerando assim os valores de letalidade.

Os moluscos sobreviventes foram lavados com água de clorada e transferidos para recipientes semelhantes aos da exposição, individualmente,

contendo água dechlorada e alface fresco, onde foram observados por mais 24 horas (período de recuperação). Neste período de recuperação, os moluscos foram avaliados quanto a retração, motilidade, resposta a estímulos, ausência/presença de excretas e alimentação.

A retração total dos moluscos em suas respectivas conchas, associada à falta de resposta a estímulos, ou a liberação de hemolinfa foram considerados como critérios de morte.

4.4 Ensaio de avaliação de ovoposição dos moluscos

Após avaliar a atividade moluscicida dos extratos estudados, foi selecionada a concentração de cada extrato que provocou menor letalidade dos moluscos. Desta forma o extrato de *A. cymbifera* diluído na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o de *P. umbellata* diluído na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram selecionados para este ensaio, gerando dois grupos de exposição aos extratos: grupo “Ac25” e grupo “Pu50”, respectivamente. Além disso, foi feito um controle negativo (C-), onde foram utilizados moluscos não submetidos a tratamento (extratos vegetais). Cada grupo continha três moluscos, que foram expostos aos extratos, ou água dechlorada, individualmente.

Os diferentes grupos foram mantidos por 24 horas com os respectivos extratos, ou apenas água dechlorada, seguindo o mesmo procedimento do ensaio de avaliação da atividade moluscicida dos extratos vegetais. Após este período de exposição, os três moluscos de cada grupo foram lavados com água dechlorada e transferidos para um recipiente único para cada grupo.

Os recipientes foram preparados exatamente da mesma forma, garantindo as mesmas condições para todos os moluscos avaliados. Assim, cada recipiente continha três moluscos, 600 mL de água dechlorada, renovada de 4 em 4 dias e um substrato de isopor para a ovoposição. Os animais foram alimentados diariamente com alface hidropônico, tomando-se cuidado para que fosse oferecida a mesma quantidade por recipiente.

O ensaio teve a duração de 15 dias (um dia de exposição aos extratos e 14 dias de avaliação do efeito sobre a ovoposição dos moluscos). Durante este período, os moluscos foram diariamente observados quanto as suas atividades gerais. As massas de ovos foram contadas de 2 em 2 dias e o número de ovos

total no 7° e 14° dias após o fim da exposição aos extratos. Dados de temperatura não foram considerados neste intervalo.

Para a contagem dos ovos foram utilizadas uma lupa e uma lanterna. As massas de ovos foram transferidas a partir do isopor para a lupa, com o auxílio de uma ponteira de pipeta, tomando-se cuidado para que não se perdesse nem um ovo, e contadas uma a uma ao serem visualizadas contra a luz.

4.5 Análise estatística

A partir dos dados de letalidade gerados após o ensaio de avaliação da atividade moluscicida, foram determinadas a DL₅₀ e a DL₉₀ tanto para *A. cymbifera* quanto para *P. umbellata* com o auxílio do software BioStat[®], utilizando-se Análise de Probit.

Para a avaliação da ovoposição dos caramujos, do número de desovas por grupo e do número total de ovos presentes nas massas, análises estatísticas descritivas e o teste de Análise de Variância (ANOVA) foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade moluscicida

Neste trabalho, foram apresentados os resultados preliminares dos estudos com extrato hidroalcoólico de raízes de *Aristolochia cymbifera* e extrato hidroalcoólico de raízes de *Pothomorphe umbellata* quanto às atividades moluscicidas. Vale ressaltar que, embora outros estudos referentes às atividades tripanossomicida e antimicrobiana, para *A. cymbifera*, e atividades tripanossomicida, antioxidante e antimalárica, para *P. umbellata*, já foram avaliados, nenhum dado de literatura foi observado para as plantas no que se refere a estudos de atividade moluscicida.

O comportamento dos moluscos do grupo controle negativo DMSO 1,7% e dos moluscos que não sofreram nenhum tipo de tratamento foi utilizado como referência para se determinarem características anormais de comportamento para os expostos aos extratos vegetais pesquisados.

Moluscos do controle DMSO 1,7% se mantiveram ativos (motilidade considerada normal) durante as 24 horas de exposição ao DMSO 1,7%, demonstraram forte adesão às paredes dos recipientes, apresentando rápida resposta a estímulo ao serem tocados por espátula. Nas 24 horas de recuperação, essas características se mantiveram e os moluscos se alimentaram normalmente. Todos os moluscos sobreviveram ao ensaio e não houve ovoposição neste período.

5.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE *Aristolochia cymbifera*

O extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* apresentou $DL_{50} = 46,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $DL_{90} = 129,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e rápido efeito sobre os moluscos testados, porém não é considerado um moluscicida ideal, de acordo com critérios estabelecidos pela OMS (1983), que define extrato vegetal bruto moluscicida ativo aquele que apresenta DL_{90} menor ou igual a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CATANHEDE *et al.*, 2010). Os valores de letalidade aos cinco moluscos, por grupo, expostos ao extrato de *A. cymbifera*, nas concentrações de 25, 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estão expostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Atividade moluscicida de extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* sobre *B. glabrata*, por um período de 24 horas.

Concentração µg.mL⁻¹	Mortalidade* %	DL₅₀ µg.mL⁻¹	DL₉₀ µg.mL⁻¹
DMSO 1,7%	0		
25	20		
50	60	46,04	129,23
100	80		

*5 moluscos por grupo.

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* 25 µg.mL⁻¹, após 24 horas de exposição, três moluscos que estavam aderidos à parede do recipiente-teste, em contato com a solução, apresentaram rápida resposta a estímulo e se locomoveram normalmente. Um não respondeu de imediato a estímulo e estava parcialmente retraído em sua concha. O quinto molusco encontrava-se totalmente retraído e sem resposta a estímulo, sendo, portanto, considerado morto dentro de 24 horas de exposição. Nas 24 horas seguintes de observação, foi constatado que um molusco apresentou sinal de debilidade, porque, apesar de estar vivo, se locomovia com muita dificuldade, apresentando baixa resposta a estímulo e possível diminuição do metabolismo, observado com a ausência de alimentação e excretas. Os três moluscos restantes possivelmente não sofreram danos.

O extrato de *A. cymbifera* 25 µg.mL⁻¹ foi selecionado para o ensaio de avaliação da ovoposição. Os moluscos a serem avaliados quanto à ovoposição foram expostos à solução-teste 25 µg.mL⁻¹ por 24 horas, antes de se iniciar o teste.

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* 50 µg.mL⁻¹, observou-se a morte de três moluscos após 24 horas de exposição ao extrato. Os dois restantes encontravam-se totalmente retraídos e com resposta a estímulo reduzida. Nas 24 horas seguintes de observação, um

dos moluscos sobreviventes excretou e se alimentou, porém, a motilidade estava reduzida e a resposta a estímulo menos vigorosa, enquanto o outro sobrevivente apresentou motilidade reduzida, porém não respondeu a estímulo e não se alimentou, havendo excreção durante o intervalo de 24 horas pós exposição.

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* 100 µg.mL⁻¹ notou-se a retração imediata dos moluscos logo no início do contato com a solução-teste, e assim se mantiveram durante as 24 horas de exposição ao extrato. No fim de 24 horas de exposição, observou-se a morte de quatro moluscos do grupo. O molusco sobrevivente não respondeu a estímulo e apresentou excretas e baixa motilidade. Nas 24 horas seguintes, essas características foram mantidas e o molusco não se alimentou.

Preliminarmente, considera-se que o extrato de *A. cymbifera* apresenta potencial moluscicida considerável, devido ao rápido efeito sobre os moluscos. Testes ecotoxicológicos são necessários para que de fato o uso desta planta seja uma alternativa ao controle da esquistossomose. Assim, *A. cymbifera* não seria o vegetal de primeira escolha para utilização como moluscicida contra a espécie *B. glabrata*, por já haver outras plantas pesquisadas com melhores resultados de DL₅₀ contra *B. glabrata* e baixa toxicidade, como é o caso de *Eleocharis sellowiana* (DL₅₀ = 24,27 µg.mL⁻¹) (RUIZ *et al.*, 2005) e de *Citrus limon* (DL₅₀ = 13,18 µg.mL⁻¹) (FERNANDES, 2011). Ressaltamos a importância medicinal de estudos com *A. cymbifera*, devido ao potencial tripanossomicida e antimicrobiano de compostos isolados desta planta (BUCKNER & NAVABI, 2010; SILVA JUNIOR *et al.*, 2013).

5.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE *Pothomorphe umbellata*

O resultado de DL₅₀ para atividade moluscicida de *P. umbellata* contra moluscos da espécie *B. glabrata* não se mostrou satisfatório (85,08 µg.mL⁻¹), portanto, preliminarmente, o extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* pode não ser indicado para este fim. Comparativamente, os resultados para atividade moluscicida de outras espécies do gênero *Piper* mostrou-se como uma alternativa viável. Como exemplo pode-se citar os extratos hidroalcoólico de *Piper cuyabanum*: o extrato hidroalcoólico de raízes apresentou 40% de

letalidade na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os extratos hidroalcoólico de frutos e de folhas apresentaram 60 e 70% de letalidade na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (RAPADO, 2012). Sendo assim, fica aqui a sugestão de novos testes com extratos de partes aéreas de plantas da espécie *P. umbellata*.

Os valores de letalidade aos cinco moluscos, por grupo, expostos ao extrato de capeba, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estão expostos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Atividade moluscicida de extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* sobre *B. glabrata*, por um período de 24 horas.

Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Mortalidade* %	DL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	DL ₉₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
DMSO 1,7%	0		
25	0		
50	20	85,08	169,54
75	40		
100	60		

*5 moluscos por grupo.

Nos moluscos expostos a extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* nas concentrações 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, houve surgimento de muco amarelo avermelhado em excesso, as vezes aparentando um aspecto de cera, no intervalo de 24 horas de exposição. A secreção de uma camada de muco para obstruir a abertura da concha é relatada no processo de anidrobiose, um tipo de resposta defensiva do molusco a condições ambientais desfavoráveis (BEZERRA, 2005).

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no fim de 24 horas de exposição, todos os moluscos do grupo permaneceram vivos, apresentando motilidade diminuída, presença de excretas e rápida resposta a estímulo, porém, dois moluscos apresentaram

fraco poder de adesão à parede do recipiente-teste. Nas 24 horas seguintes, os moluscos apresentaram fraco poder de adesão à parede ou ao alimento, baixa motilidade, com presença de muco denso opaco e excreção, porém com resposta a estímulo rápida e vigorosa. Dois moluscos se alimentaram pouco e os demais não se alimentaram.

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* 50 µg.mL⁻¹, foi observada a morte com extravasamento de hemolinfa de um dos moluscos do grupo, sendo que os demais foram encontrados parcialmente retraídos em suas respectivas conchas, apresentando resposta a estímulo diminuída e excretas junto ao muco denso produzido, após 24 horas de exposição ao extrato. Nas 24 horas seguintes, foi observado um possível efeito debilitante sobre os moluscos sobreviventes, que apresentaram baixo poder de adesão às paredes dos recipientes, resposta a estímulo diminuída ou nula, baixa motilidade, com ausência de alimentação e grande quantidade de excreta e de muco amarelado. Um dos moluscos apresentou pequena quantidade de hemolinfa extravasada em seu recipiente-teste.

O extrato de *P. umbellata* 50 µg.mL⁻¹ foi selecionado para o ensaio de avaliação da ovoposição. Os moluscos que seriam avaliados quanto à ovoposição foram expostos à solução-teste 50 µg.mL⁻¹ por 24 horas, antes de se iniciar a avaliação.

Para se determinar a DL₅₀, estatisticamente, de *P. umbellata*, foi necessário realizar o ensaio em uma concentração diferente. A concentração selecionada foi de 75 µg.mL⁻¹. Após 24 horas de exposição ao extrato, foi observada a morte com extravasamento de hemolinfa de dois moluscos do grupo. Os três moluscos sobreviventes se encontraram parcialmente retraídos, com resposta a estímulo lenta e com presença de excreta. Nas 24 horas seguintes, dois moluscos apresentaram fraco poder de adesão à parede de seus respectivos recipientes-teste, com motilidade fraca, resposta a estímulo diminuída, presença de muco espesso e amarelo e de excreta e ausência de alimentação. O último molusco apresentou muco espesso e excreção porém, apesar de normalmente retraído, não apresentou resposta a estímulo, nenhuma motilidade, e ausência de alimentação.

No grupo de moluscos expostos ao extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* 100 µg.mL⁻¹, foi constatada a morte com presença de hemolinfa e

muco de três moluscos após 24 horas de exposição. Os outros dois moluscos encontravam-se parcialmente retraídos e com baixa resposta a estímulo, não havendo presença de excretas em nenhum recipiente. Nas 24 horas seguintes, os moluscos sobreviventes foram encontrados fracamente aderidos à parede do recipiente-teste, com motilidade fraca e resposta a estímulo lenta. Estes moluscos não se alimentaram.

Conforme explanado anteriormente, destacamos o potencial antioxidante, antileishmania, tripanossomicida, antimalárico e antibacteriano dos compostos isolados deste vegetal (MACHADO, 2014).

5.2 Avaliação de ovoposição

A avaliação da ovoposição teve duração de 14 dias, contados após 24 horas de exposição de três moluscos, individualmente, às condições de avaliação para cada grupo (extrato vegetal ou água declorada).

No 14º dia do ensaio foi feita a contagem do número total de ovos presentes nas massas depositadas nos substratos. Foi observado que todos os ovos apresentavam massa embrionária fértil, estando alguns em estágio avançado de desenvolvimento, de acordo com estudos realizados por Kawazoe (1977). O grupo Ac25 apresentou média de 26 ± 13 ovos por massa e o grupo Pu50 apresentou média de 36 ± 11 ovos por massa (**Tabela 3**).

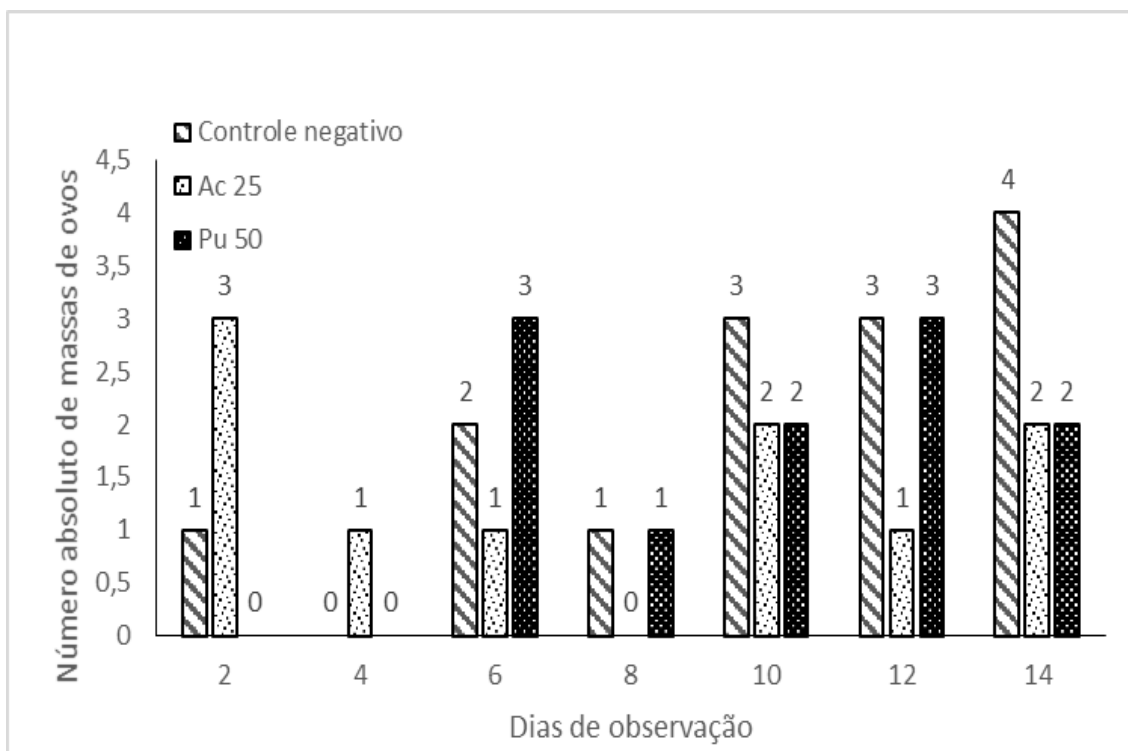
Tabela 3. Atividade dos extratos de *A. cymbifera* (Ac25) e *P. umbellata* (Pu50) sobre a ovoposição de moluscos da espécie *B. glabrata* durante o período observado de 14 dias.

Grupos	Total de ovos	Total de massas	Média de ovos por massa (\pm desvio padrão)	Mín. – Máx. de ovos por massa
C-	523	14	37 ± 6	25 – 44
Ac25	264	10	26 ± 13	6 – 39
Pu50	396	11	36 ± 11	18 – 54

Como pode ser observado na **Tabela 3**, houve redução da ovoposição após a exposição de moluscos da espécie *B. glabrata* aos extratos vegetais de *A. cymbifera* e *P. umbellata* nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Após análise estatística, pode-se observar diferença significativa entre os grupos Ac25 e C- ($p = 0,0306$), com uma redução de aproximadamente 50% no número total de ovos obtidos após 14 dias, não sendo observado diferença estatística entre os grupos C- e Pu50. A diferença de número total de massas de ovos entre os grupos não foi significativa estatisticamente ($p = 0,1589$).

Ressaltamos que, durante todo o período de avaliação da ovoposição, observou-se que os moluscos dos grupos Ac25 e Pu50 se alimentaram e excretaram menos em relação controle negativo. No quarto dia de avaliação, foi observado que o isopor do controle negativo acumulou uma desova e o do grupo Ac25 acumulou 4 desovas, no entanto, o grupo Pu50 não apresentou desova, como pode ser observado no gráfico apresentado na **Figura 3**.

Figura 3. Gráfico de frequência absoluta de postura de massa de ovos por moluscos da espécie *B. glabrata*, após exposição aos extratos de *A. cymbifera* e *P. umbellata*, por dia de observação.



O fato de o grupo Pu50 não ter apresentado postura dentro dos primeiros 4 dias, pode estar relacionado ao efeito observado que se seguiu após a retirada dos moluscos do contato com a droga, para posterior análise da ovoposição. Foi observado que os moluscos não se alimentaram, não ovopuseram e apresentaram motilidade lenta por 4 dias após o fim da exposição ao extrato hidroalcoólico de *P. umbellata*. A partir de 96 horas após o fim da exposição ao extrato foi observada a reversão espontânea dessas manifestações, quando os moluscos voltaram a se alimentar, mas sem ovoposição. A ovoposição voltou ao normal 5 dias após a exposição ao extrato de *P. umbellata*, com postura de 3 massas de ovos.

Com base nessas observações, constata-se que o extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* afeta os moluscos com um efeito debilitante sobre parâmetros de atividades gerais (motilidade, alimentação e reprodução) de forma espontaneamente reversível a partir de 96 horas após a exposição dos moluscos aos extratos.

6 CONCLUSÃO

Os extratos hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* e *P. umbellata* apresentaram atividade moluscicida contra moluscos da espécie *B. glabrata*, porém, de acordo com os critérios da OMS (1983), esses extratos não são considerados ideais por apresentarem valores de DL_{90} maiores que o máximo estabelecido ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O extrato hidroalcoólico de raízes de *P. umbellata* apresentou ação mais debilitante e duradoura quando aplicado de forma aguda (exposição por 24 horas), enquanto o extrato hidroalcoólico de raízes de *A. cymbifera* apresentou maior efeito de mortalidade.

Com os dados de ovoposição dos moluscos, conclui-se que a postura de massas de ovos para os grupos de moluscos expostos aos extratos de *A. cymbifera*, *P. umbellata* e controle negativo não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,1589$), porém, os dados relativos ao número total de ovos apresentaram diferenças significativas ($p = 0,0306$) apenas para o grupo de moluscos expostos ao extrato de *A. cymbifera*, evidenciando-se uma possível alteração no ciclo reprodutivo dos invertebrados.

7 REFERÊNCIA

BARDELLI, K.C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A.V.G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da microbacia do sítio Cabaçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Revista Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 553-61, 2008.

BEZERRA, F.S.M. Moluscos transmissores de *Schistosoma mansoni*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª Edição. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2005. Capítulo 23, p. 213-22.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose – Situação Epidemiológica**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 06 agostos 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde – 1ª Edição**. Brasília, 2014a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/06/guia-vigilancia-saude-atualizado-05-02-15.pdf>> Acesso em: 13 julho 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas – 4ª Edição**. Brasília, 2014b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf> Acesso em: 22 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica – 2ª Edição**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_moluscos_import_epidemi_2ed.pdf> Acesso em: 15 julho 2016.

BUCKNER, F.S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 2013.12 p. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603362/pdf/nihms-441477.pdf>> Acesso em: 12 julho 2016.

CANTINHA, R.S. **Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP70**. 2012. 103 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CATANHEDE, S.P.D; MARQUES, A.M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A.L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 282-8, 2010.

COELHO, P.M.Z.; CALDEIRA, R.L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 57, p. 1-6, 2016.

COSTA, M.V.S.M. **Análise bioquímica da niclosamida no metabolismo de cisticercos de *Taenia crassiceps***. 2015. 63 p. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. Determinação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*) indicadora regional. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 401-407, 2011.

FERNANDES, R.P. **Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais da folha de *Pimenta dioica* Lindl, casca de *Citrus limon* e rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe**. 2011. 130 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FRANCISCO, C.S.; MESSIANO, G.B.; LOPES, L.M.X.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E.; CAPELLARI JUNIOR, L. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, São Paulo, v. 69, p. 168-75, 2008.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Piper umbellatum* L. = *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Fito**, v. 5, n. 2, p. 35-44, 2010.

GIOVANELLI, A.; SILVA, C.L.P.A.C.; MEDEIROS, L.; VASCONCELLOS, M.C. The molluscicidal activity of Niclosamide (Bayluscide WP70[®]) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 743-5, 2002.

GOMES, E.C.S.; DOMINGUES, A.L.C.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; SANTOS, K.R.P.; REHN, V.N.C.; LIRA, M.M.M.; BARBOSA, C.S. First record of prostatic schistosomiasis in Pernambuco, Brazil: signs of chronicity in a endemic disease. **Revista de Patologia Tropical**, v. 45, n. 1, p. 132-8, 2016.

HERNANDES, L.S. **Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera.** 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) – Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JIN, Y.; LU, Z.; DING, K.; LI, J.; DU, X. CHEN, C.; SUN, X.; WU, Y.; ZHOU, J.; PAN, J. Antineoplastic mechanisms of Niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF- κ B pathway and generation of reactive oxygen species. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2516-27, 2010.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II – Fecundidade e fertilidade. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 11, p.47-64, 1977.

KING, C.H.; SUTHERLAND, L.J.; BERTSCH, D. Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical-based mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1-23, 2015.

LI, Y.; LI, P.K.; ROBERTS, M.J.; AREND, R.C.; SAMANT, R.S.; BUCHSBAUM, D.J. Multi-targeted therapy of cancer by Niclosamide: A new application for an old drug. **Cancer Letters**, v. 349, n.1, p. 8-14, 2014.

MACHADO, R.D. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização de extratos vegetais obtidos a partir das raízes de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae)**. 2014. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MASSARA, C.L.; ENK, M.J.; CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.F.; SCHOLTE, R.G.C.; CARVALHO, O.S. Ocorrência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em parques da cidade de Belo Horizonte, Minas gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 471-9, 2012.

MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11^o Edição. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2005. Capítulo 22, p. 193-212.

MORAES, J. **Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011. 185 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2011.

NASCIMENTO, A.I.P. **Análise epidemiológica da esquistossomose em áreas de risco em São Luís – MA**. 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Centro Universitário do Maranhão, São Luís, 2011.

PARAENSE, W.L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2-3-4, p. 277-84, 1955.

PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; LOPES, W.; CARDOSO, L.G.V., CARVALHO, J.C.T.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 215-20, 2005.

PILE, E.A.M.; PASTOR, N., SANTOS, J.A., BARROS, J.S.L. Aspectos histopatológicos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1817, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, submetida a niclosamida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 218-9, 2002.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M.; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-75, 2008.

RAPADO, L.N. **Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica**. 2012. 142 p. Tese (doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2012.

RAUBER, C.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar. **Acta Scientae Veterinarie**, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2006.

RODRIGUES, E.R.; NOGUEIRA, N.G.P.; ZOCOLO, G.J.; LEITE, F.S.; JANUARIO, A.H.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; FACHIN, A.L.; MARCHI, M.R.R.; SANTOS, A.G.; PIETRO, R.C.L.R. *Pothomorphe umbellata*: antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 265-9, 2012.

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica de em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.

RUSCHEL, D. **O gênero *Piper* (Peperaceae) no Rio Grande do Sul**. 2004. 144 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SACOMAN, J.L.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G.M.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 411-5, 2008.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/esquistossomose/doenca>> Acesso em: 23 julho 2016.

SILVA FILHO, C.R.M.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, T.G.; SILVA, T.M.S.; RIBEIRO, A.P.L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 919-23, 2009.

SILVA JUNIOR, W.F.; CECÍLIO, S.G.; MAGALHÃES, C.L.B.; FERRERIRA, J.M.S.; TÓTOLA, A.H.; MAGALHÃES, J.C. Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potencial antibacterial drug. **Springer Open Journal**, v. 4, n. 30, p. 1-7, 2013.

SILVA, N.F.S.; COGO, J.; WIEPIESKI, C.C.P.; LAVERDE JR, A. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 179-81, 2008.

SILVA, V.V. **Emprego do extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* na prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese induzida pela radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pelo**. 2007. 138 p. Tese (Doutorado em Insumos Farmacêuticos) – Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA JÚNIOR, A.S.; SOUZA, A.S.; SOARES-SOUZA, L.; ZANETTI, G.; MARCHIORI, E. Sinal do halo invertido em esquistossomose aguda. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São José do Rio Preto, v. 41, n. 3, p. 286-288, 2015.

VITORINO, R.R.; SOUZA, F.P.C.; COSTA, A.P.; FARIA JÚNIOR, F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WU, T.S.; DAMU, A.G.; SU, C.R.; KUO, P.C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 21, p. 594-624, 2004.